

08.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 9 月 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 0 8 9 3 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 0 8 9 3 3]

REC'D 02 DEC 2004

WIPO

PCT

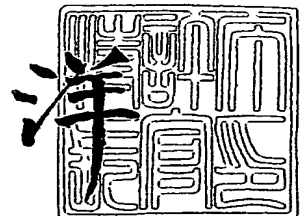
出 願 人
Applicant(s): 有限会社アーズ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 188728
【提出日】 平成15年 9月 1日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 31/765
A23K 1/16 303

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県西宮市柏堂西町 7 - 2 3
【氏名】 牛田 一成

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市大將軍 1 - 2 - 1 - 2 1 3
【氏名】 栗山 昌樹

【特許出願人】
【住所又は居所】 京都府京都市右京区花園扇野町 4 9 番地
【氏名又は名称】 有限会社アーザス

【代理人】
【識別番号】 100081422
【弁理士】
【氏名又は名称】 田中 光雄
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】
【識別番号】 100106518
【弁理士】
【氏名又は名称】 松谷 道子
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】
【識別番号】 100116311
【弁理士】
【氏名又は名称】 元山 忠行
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】
【識別番号】 100122301
【弁理士】
【氏名又は名称】 富田 憲史
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】
【識別番号】 100127638
【弁理士】
【氏名又は名称】 篠田 美苗
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 204804
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】

明細書 1

【物件名】

要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを大腸に送達するための、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を含有する組成物。

【請求項 2】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸が、 β -ヒドロキシ酪酸、 β -ヒドロキシプロピオン酸、 β -ヒドロキシ吉草酸、 β -ヒドロキシカプロン酸、 β -ヒドロキシカプリル酸、 β -ヒドロキシカプリン酸およびこれらの混合物からなる群から選択される、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸の単独重合体である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸共重合体である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

β -ヒドロキシ酪酸の単独重合体もしくは共重合体である、請求項 1～4 いずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体が水不溶性である、請求項 1～5 いずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体の重量平均分子量が 1,000～20,000,000 である、請求項 1～6 いずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体が微生物により産生されたものである、請求項 1～7 いずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を含有する微生物を含有する、請求項 8 記載の組成物。

【請求項 10】

微生物が、セレン、コバルト、マンガン、亜鉛および銅からなる群から少なくとも 1 種を含有する請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体が植物により産生されたものである、請求項 1～7 いずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

動物飼料、または動物飼料添加物である、請求項 1～11 いずれかに記載の組成物。

【請求項 13】

健康食品である、請求項 1～11 いずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

ヒトを含む動物用医薬組成物である、請求項 1～11 いずれかに記載の組成物。

【請求項 15】

ヒトを除く動物に β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を経口摂取させることにより、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを該動物の大腸に送達させる方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】 β -ヒドロキシ脂肪酸の大腸への送達方法および該方法に用いられる組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、大腸において吸収され、生理活性を示す β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸モノマーもしくはそのオリゴマーを、経口投与によって大腸まで送達させる方法および該方法に用いられる組成物を提供する。

【背景技術】

【0002】

近年の研究により、短～中鎖脂肪酸の動物に対する生理作用が解明されつつある。短鎖脂肪酸は大腸において以下の生理作用を示すことが知られている。また中鎖脂肪酸については下記6の生理作用を示すことが知られている。

【0003】

1. 腸管上皮細胞増殖促進
2. 腸管運動およびイオン輸送（水やイオンの吸収）の活発化
3. 大腸粘膜の血流増加
4. 大腸の粘液分泌増加
5. 内分泌の調節（インスリン分泌促進、異化作用ホルモンの分泌抑制）
6. 膵外分泌（消化液）の分泌促進
7. 大腸内細菌への影響（乳酸発酵菌の増殖刺激、大腸菌の増殖抑制）

【0004】

即ち、短～中鎖脂肪酸は動物の消化管の発育や保護、および消化・吸収の促進、代謝の同化効果など人や家畜、家禽、魚などの脊椎動物全般にとって重要かつ有用な働きを有するものである。

【0005】

しかしながら、短～中鎖脂肪酸を単独で経口投与しても小腸で吸収されて大腸まで送達させることができない。また、大腸まで到達させ、大腸で溶解するカプセル等の、大腸において吸収させるための優れたドラッグデリバリーシステムは開発されてない。また直接大腸に注腸する方法があるが、その濃度や供給期間の制御等に課題が残り実用性に欠ける。

【0006】

一方、水溶性の食物繊維やオリゴ糖などの難消化性糖質を経口摂取させ、これを大腸まで到達させ、大腸内細菌の発酵によって短鎖脂肪酸に変換生産させて利用する方法も検討されている。しかしながら、かかる手段によっても投与した難消化性糖質の必ずしも全量が短鎖脂肪酸へと変換されるわけではない。即ち、炭酸ガス等に代謝されたり菌体成分として利用されたり、また乳酸やコハク酸などの他の有機酸も合わせて生産されるなどの理由から短鎖脂肪酸の生産効率は元来低い。さらに難消化性糖質の発酵速度は摂取形態や食品中での存在形態により大きく影響され、発酵速度が高まると他の有機酸の生産が多くなるなど、他の有機酸と短鎖脂肪酸の生成比率は大きく変動する。乳酸が多く生産あるいは蓄積されると下痢を起こすなど、他の生成物による悪影響が現れる場合もある。

以上のように、短～中鎖脂肪酸を制御して大腸に送達させるための実用的な方法は現在まで開発されていない。

【0007】

一方、ヒドロキシ脂肪酸重合体としては、最初に β -ヒドロキシ酪酸重合体が1925年にLemoigneらによって発見された（非特許文献1）後、物質としての構造が明らかにされ、微生物におけるエネルギー貯蔵体であり微生物の栄養源やエネルギー源であることが解明された。次いで1974年Wallenらによって β -ヒドロキシ酪酸と β -ヒドロキシ吉草酸との共重合体が自然界の菌体より発見（非特許文献2）されたことが契機となり、多くの研究がなされている。そして、微生物は多種のヒドロキシ脂肪酸重合体を産生するこ

とが明らかにされた。ヒドロキシ脂肪酸重合体は熱可塑性でありプラスチックとしての利用が検討されている。

【0008】

ヒドロキシ脂肪酸重合体をエネルギー貯蔵体として微生物以外に応用した例については、次のような報告がある。特許文献1はヒドロキシ脂肪酸重合体の $0.1 \sim 10 \mu m$ の粒子のエマルジョンが食感の類似から脂肪やクリームの代替として用いられることについて開示するが、体内における吸収やその代謝エネルギーについての言及は無い。

【0009】

特許文献2はポリヒドロキシアлкаノエートを含む、動物飼料組成物を開示する。特許文献2は、ポリヒドロキシアлкаノエート（ヒドロキシ脂肪酸重合体）が動物飼料の代謝可能なエネルギー含量を増強させるとして摂取させた際のエネルギーに着目しているが、その体内における分解機構や分解率についての言及はない。多くの微生物がヒドロキシ脂肪酸重合体の分解酵素をもつことは知られているが（非特許文献3）、動物がヒドロキシ脂肪酸重合体の分解酵素を産生するという報告は見つからない。またヒドロキシ脂肪酸重合体は化学的に安定であり、胃酸や胆汁などが示す酸・アルカリ条件下では容易に加水分解しない。

【0010】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体の大腸内細菌による分解や生理作用には同じく言及していないが、実際に動物に摂取させた次の研究がある。非特許文献4は微生物蛋白を動物の蛋白質源として利用する検討であるが、用いた微生物が β -ヒドロキシ酪酸重合体を副生するためにその影響の有無を調べている。ブタに摂取された β -ヒドロキシ酪酸重合体の内、約65%が糞中から回収された。肝臓や腎臓、筋肉等の器官中にこの重合体残渣は見つからなかったもので、残りの約35%は腸内で代謝されたのではと推測している。

【0011】

非特許文献5は β -ヒドロキシ酪酸- β -ヒドロキシ吉草酸共重合体を代謝エネルギーとして利用する研究である。この共重合体はブタ体内ではほとんど分解されなかったが、水酸化ナトリウムを用いて加水分解して水溶化した場合にこの水溶化物が代謝されたという結果が報告されている。またこの共重合体の粒子の大きさや結晶状態が分解に影響するのではないかと推測している。

【0012】

非特許文献6および7はヒツジにおいて、 β -ヒドロキシ酪酸- β -ヒドロキシ吉草酸共重合体はほとんど分解されないが、粒子径を小さくしたり水酸化ナトリウムで前もって加水分解すると代謝されたと報告している。しかしながらかかる共重合体の生理作用については言及していない。

【0013】

以上のように β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体をエネルギー源として動物に用いることについては従来技術で試みられているが、エネルギー源として利用される以外に何らかの生理活性を有することについては従来技術は何ら言及していない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体が大腸内細菌によって分解され、その分解生成物である β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーが、大腸において上述の短～中鎖脂肪酸の作用に類似した生理作用を有することを、本発明者らは見出した。本発明はこの生理活性作用を有する β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを大腸へ送達するための組成物を提供することを目的とする。

【0015】

本発明はさらに、経口投与によってこの β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを大腸まで到達させることができる送達方法を提供することを目的とする。

【0016】

【特許文献1】特表平5-503637号公報

【特許文献2】特表2002-500027号公報

【非特許文献1】Ann. Inst. Past., 39, p144-173(1925))

【非特許文献2】Environ. Sci. Technol., 8, p576-579(1974)

【非特許文献3】Biotechnol. Bioeng., 49, p1-14(1996)

【非特許文献4】Z. Tierphysiol. Tierernähr. u. Futtermittelkde., 38, p81-93(1977)

【非特許文献5】Ann. Zootech., 48, p163-171(1999)

【非特許文献6】J. Anim. Phys., 81, p31-40 (1999)

【非特許文献7】J. Anim. Phys., 81, p41-50 (1999)

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を経口摂取した場合、胃や小腸で分解を受けず、大腸で初めて大腸内細菌によって分解されることを見出した。この大腸内細菌による分解生成物である β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸モノマーまたはオリゴマーは、従来知られている短～中鎖脂肪酸と同様の生理作用を含む種々の生理作用を発現することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0018】

即ち本発明は、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを大腸へ送達するための、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を含む組成物を提供する。

【0019】

短～中鎖脂肪酸の β -ヒドロキシ化合物を重縮合して得られる重合体は、胃や小腸で分解、吸収されることなく大腸まで送達される。大腸まで送達された重合体は大腸内細菌叢に含まれる細菌によって分解され、水溶性の β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸モノマーまたはオリゴマーとなり、大腸から吸収されて生理作用を発揮する。

【0020】

本発明において、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸とは炭素原子数3～12の飽和脂肪酸を意味する。好ましくは、 β -ヒドロキシ酪酸、 β -ヒドロキシプロピオン酸、 β -ヒドロキシ吉草酸、 β -ヒドロキシカプロン酸、 β -ヒドロキシカプリル酸および β -ヒドロキシカプリン酸が例示される。

【0021】

本発明の β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体としては、これらモノマーの単独重合体であっても、2以上の短～中鎖脂肪酸の共重合体であってもよい。特に β -ヒドロキシ酪酸の単独重合体または β -ヒドロキシ酪酸とその他の1以上の β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸との共重合体が好適に用いられる。共重合体としては β -ヒドロキシ酪酸と β -ヒドロキシ吉草酸の共重合体が特に好適に用いられる。

【0022】

本発明の β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体には、 β -ヒドロキシ脂肪酸またはそのオリゴマーの生理作用を妨げない限り、他のモノマー単位を含んでもよい。

【0023】

本発明の組成物において、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は、水不溶性であればその重合度は特に限定的ではない。重合体が水溶性であれば、経口投与されるとそのままの形で、あるいは胃や小腸における酸、アルカリ条件下で加水分解された形で大腸へ到達する前に吸収される。

【0024】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体においては、重合度がほぼ10以上となると水不溶性となる。従って例えば β -ヒドロキシ酪酸重合体であれば重量平均分子量が1000以上のものが好適に用いられる。重合体分子量の上限としては特に限定的ではなく、重合体として製造できるものであればいずれも本発明に用いることができる。例えば、微生物により重量平均分子量20,000,000以上の β -ヒドロキシ酪酸重合体を得たという報告がある (Appl. Microbiol. Biotechnol., 47, p140(1997))。本発明で用いられる β -

ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体として、好ましくは重合体の重合度50～100,000、より好ましくは重合度100～20,000のものが例示される。

【0025】

本明細書において、「 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸のオリゴマー」とは、特に断らない限り水溶性のオリゴマーを意味するものとする。

【0026】

本発明はさらに、ヒトを除く動物に β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を経口摂取させる、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを該動物の大腸に送達させる方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明において「動物」とはヒトを含む哺乳動物のみならず、魚類、鳥類等脊椎動物をいう。脊椎動物の大腸内には、多くの種類の細菌が数多く生息して細菌叢を形成している。その細菌は、胃や小腸で消化されなかった食物を発酵によって短鎖脂肪酸等に変える。そして、脊椎動物はそれを吸収してエネルギーや栄養素として利用していることが知られている。(J.Exp.Zool.Suppl.,3,p55(1989);Physiol.Rev.,78,p393(1998))。人や豚、羊などの哺乳類に関する研究はいうまでもなく、鶏やアヒルなどの鳥類、鯉などの魚類に関する研究も多くなされている(Physiol.Res.,47,p259(1998);Comp.Biochem.Physiol.A:Mol.Integr.Physiol.,131,p657(2002);Comp.Biochem.Physiol.A:Mol.Integr.Physiol.,132,p333(2002);Appl.Environ.Microbiol.,68,p1374(2002))。このように脊椎動物は全般的に、大腸内に細菌叢を有することから、本発明の組成物は脊椎動物に有効である。特に哺乳類、鳥類、魚類に有用である。

【0028】

本発明において大腸とは、盲腸、結腸、直腸で構成される消化器官をさす。動物種によって消化器管の未分化、未発達により小腸と大腸の区別が明確でない場合、細菌叢があり発酵を行っている腸の部位をさす。

【0029】

本発明の β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は、公知のいかなる方法を用いて調製してもよい。例えば、原料となる β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸モノマーを脱水重縮合する常套のポリエステル合成方法により得ることができる。

【0030】

また、微生物あるいは高等生物により産生される β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を用いてもよい。

【0031】

β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を産生する多くの細菌が知られており(Microbiol.Rev.,54,p450(1990);Microbial Polyesters,VCH Publishers,1990;Biomaterials,p124,Stockton Press,1992)、かかる細菌により産生されるものも好適に用いられる。細菌により産生された β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は、菌体から分離して用いても、菌体と共に用いてもよい。細菌は一般に蛋白質の含有率が高く、本発明の組成物を飼料や健康食品として採用する場合には、蛋白源としても有用である。

【0032】

公知の微生物の中でもラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)、アルカリゲネス・ラタス(*Alcaligenes latus*)は β -ヒドロキシ酪酸重合体を大量に生産することが知られている。特にラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)は、過去に微生物蛋白として検討されたが、菌体自体の成分に占める蛋白質含有率が高く、また、従来成長促進のために添加されているセリンやグリシン等のアミノ酸含有率も多い。したがって、 β -ヒドロキシ酪酸重合体などを提供するためのみならず、蛋白源としても有効性が高く、飼料や食品へ配合する場合には特に好ましい。

【0033】

また、J.Bacteriol.,170,p4431やp5837(1988)およびScience,256,p520(1992)をはじめ

、ヒドロキシ脂肪酸重合体を元来生産しない微生物や植物に遺伝子組換えの技術を用いてヒドロキシ脂肪酸重合体を生産可能とする技術が開発されている。本発明において用いるβ-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体としては、かかる遺伝子組換え技術により得られる微生物や植物が産生する重合体を用いてもよい。重合体は微生物や植物から単離して用いても、あるいは該重合体を含有する微生物や植物自体を用いてもよい。

【0034】

本発明の一態様において、微生物がセレン、コバルト、マンガン、亜鉛および銅からなる群から選択される1種以上の微量成分を含有する。微生物へかかる成分を含有させるには、適当な塩の形態とした所望の微量成分を配合した培地を用いて微生物を培養すればよい。微生物の培養条件および培養に用いられる培地は周知であり、使用する微生物に応じて適宜選択すればよい。

【0035】

本発明において、β-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は、経口投与、経鼻チューブ投与および大腸内への直接注腸等の方法により投与される。経口投与がより容易で実用上好ましい。β-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は動物の体内においては大腸内細菌によってはじめて分解可能となる。従って経口投与した場合でも小腸で消化吸収されてエネルギー源となるのではなく、大腸まで重合体として送達して、大腸においてはじめて分解され、利用される。

【0036】

本発明のβ-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体重合体の分解によって生成した、水溶性のモノマーもしくはオリゴマーは、大腸より吸収されて生理作用を示す。本発明のβ-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体の投与によって、従来から短～中鎖脂肪酸の作用として知られていた下痢／軟便の抑制、糞便水分率の低下、成長促進などの効果のほかに、新たに、飲水量と排尿量の減少、便臭の軽減、排便回数の増加、ストレス緩和、胃や大腸の滞留物量の減少、小腸・大腸・腎臓などの重さの減少、窒素蓄積効率の増加および窒素排出率の減少、尿中への窒素排出割合の低下などの種々の活性が発揮されることを観察した。

【0037】

β-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体が大腸内細菌によって分解され、短～中鎖脂肪酸の作用として知られた以外に、新たに多くの作用を示すことは、本発明者らが今回初めて発見した。

【0038】

本発明のβ-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を含有する組成物は、脊椎動物全般に適用することができる。本発明の組成物は、大腸の働きを活発化することに関連する種々の用途に用いることができる。

【0039】

したがって、本発明のβ-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は哺乳動物や鳥類、魚類などを飼育乃至養殖する際の飼料や飲料等へ配合しても、あるいはかかる飼料や飲料等へ配合するための添加物として提供されてもよい。即ち本発明の組成物は、家畜、家禽、養殖魚および愛玩動物などの健康状態の維持、改善、成長の向上さらに糞尿の臭気や処理の改善を目的とした飼料および飼料添加剤として好適に用いられる。

【0040】

本発明の組成物はまた、健康状態の維持管理や疾病予防を目的とする健康食品として好適に用いられる。また本発明の組成物は、便秘、下痢予防または治療用医薬組成物として、さらに上記本発明の組成物の種々の作用により改善され得る疾患を予防または治療するための医薬組成物として好適に用いられる。

【0041】

したがって、β-ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体が特定の疾患の治療を目的とするヒトを含む動物用医薬組成物として提供される場合、あるいは特定の疾患の予防や総合的な健康状態を維持乃至向上させるための健康食品、もしくは食品添加物として提供される場合も本発明の範囲に含まれる。

【0042】

本発明の組成物がヒトを含む動物用医薬組成物乃至は健康食品として提供される場合、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、舌下剤、トローチ、咀嚼可能錠剤、懸濁液等、経口投与により投与されるあるいは経口により摂取されるいかなる形態であってもよい。これらの投与製剤は、常套法により調製することができる。また本発明の組成物は、食品や飲料等へ配合して経口摂取に供してもよい。

【0043】

本発明の組成物へ、医薬上許容される適当な添加剤を含有させてもよい。添加剤としては特に限定されず賦形剤、希釈剤、増量剤、溶剤、潤滑剤、補助剤、結合剤、崩壊剤、被覆剤、カプセル化剤、乳化剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、保存剤、抗酸化剤、矯味剤、芳香剤、着色剤など、製剤学に関する一般書籍に記載されているものから必要に応じて適宜選択すればよい。

【0044】

さらに本発明の組成物には、本発明の目的に反しない限り、別種の薬効成分を適宜含有させることができる。

【0045】

本発明の組成物を飼料として調製する場合、飼料の組成としては特に限定的ではなく、目的とする対象に応じて従来知られている飼料に β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を適宜配合すればよい。本発明の飼料組成物には、本発明の目的に反しない限り、別の生理活性物質を配合してもよい。

また、飼料へ配合して動物に投与させるための飼料添加剤として調製してもよい。

【0046】

本発明に用いられる重合体が微生物によって産生されるものである場合には、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を含有する微生物ごと配合してもよい。微生物ごと配合する場合、微生物自体も蛋白源として有効に利用される。また、微生物により β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を産生させると共に微生物中へ常套の方法により必須微量元素を含有させ、微生物ごと配合すれば、蛋白源としてのみならず、微量金属元素源としても有効に利用される。

【0047】

本発明において β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体の使用量としては特に規定はなく、投与対象の種別、体重、性別、健康状態、投与目的等によって適宜決定されるべきである。およその目安としては、10mg～500mg/kg体重である。1回で与えても良いし複数回に分けて与えることもできる。あるいは飼料、飲料や食品に0.1～5重量%配合して与えてもよい。目的に応じて増減してもよいのは言うまでもない。

【0048】

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体の調製

参考例1： 下記に示す培地30Lにラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha)の前培養物を接種して、30℃、アンモニア水を用いてpH6.8に制御しながら通気、攪拌下で、消費されたグルコースを適宜補給しながら増殖させた。所定の菌体濃度に達したら、アンモニア水を水酸化ナトリウム溶液に変えて重合体の蓄積を開始させた。グルコースの補給を継続して通算3日間培養して β -ヒドロキシ酪酸重合体を含む菌体を得た。遠心機で集菌後、プロテアーゼ処理ついで過酸化水素水処理を行って重合体を単離、回収し、更に水洗後乾燥した。

【0049】

培地組成：

グルコース 20 g/L

硫酸アンモニウム 8 g/L

硫酸マグネシウム7水和物 0.5 g/L

硫酸カリウム 1.5 g/L

1 規定リン酸 20 ml
 微量ミネラル液 50 ml
 組成: 塩化カルシウム 2水和物 2.6 g/L
 硫酸第1鉄 7水和物 0.6 g/L
 硫酸銅 5水和物 20 mg/L
 塩化マンガン 4水和物 90 mg/L
 硫酸亜鉛 7水和物 100 mg/L

【0050】

得られた重合体をNMRで分析し、 β -ヒドロキシ酪酸重合体であることを確認した。ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) 測定で重量平均分子量 839,000 (ポリスチレン換算) の重合体の粉末が 58.8 g/L 培地の収量で得られた。

【0051】

参考例 2: 参考例 1 で使用した培地 2,000 L に対し、重合体蓄積時の補給炭素源としてグルコース (9割) とプロピオン酸 (1割) を用いる以外は参考例 1 と同様にして (β -ヒドロキシ酪酸- β -ヒドロキシ吉草酸) 共重合体の粉末を得た。得られた共重合体中、 β -ヒドロキシ吉草酸単位は 5.4 モル%であった (NMR 測定結果)。また重合体の重量平均分子量は 737,000 (GPC 測定結果) であり、収量は 49.8 g/L 培地であった。

【0052】

参考例 3: 参考例 1 の発酵時間を短くして、 β -ヒドロキシ酪酸重合体 (NMR 確認。重量平均分子量: 869,000 (GPC 測定結果)) を 23.6 重量% 含有する菌体を得た (菌体乾燥収量 = 105.4 g/L 培地)。得られた菌体の栄養素分析結果を表 1 に示す。表 1 から明らかなように、 β -ヒドロキシ短~中鎖脂肪酸重合体を含む微生物は、蛋白源としての有用性も兼ね備えている。

【0053】

【表 1】

 β -ヒドロキシ酪酸重合体を含む菌体の栄養素分析

分 析 項 目	結 果 (%)
水分	1.8
粗蛋白質 (換算係数: 6.25)	64.2
粗脂肪	0.8
粗繊維	0
粗灰分	3.9
可溶無窒素分 (計算式 = 100 - 上記 5 項目計)	29.3

【0054】

大腸内細菌による分解試験:

ブタの盲腸に付けたカニューレから採取し、Pipes 緩衝液 (pH 6.5) で 5 倍に希釈後ガーゼでろ過した盲腸内液 50 ml に、被検試料 0.5 g 添加した。嫌気雰囲気下 (窒素 80%, 炭酸ガス 20%) 37℃ で 24 時間培養した。その後、イオンクロマトグラフィーで分析した。

試料として参考例 1 で得た β -ヒドロキシ酪酸重合体の粉末および参考例 3 で得た β -ヒドロキシ酪酸重合体を含む乾燥菌体 (ラルストニア・ユートロファ) を用いた。

【0055】

イオンクロマトグラフィーによると、両者とも通常盲腸内にある有機酸以外に新しく β -ヒドロキシ酪酸重合体の分解物に起因する大きなピークが観察され、 β -ヒドロキシ酪酸のリン酸エステルと推定された。リン酸は盲腸内液由来と考えられる。更に 24 時間培養を継続して分析すると、オリゴマーと推測される大きなピークが 2 本新たに観察された。分解生成物のピーク面積から換算した濃度から β -ヒドロキシ酪酸重合体の分解率は参考例 1 の粉末が約 30%、参考例 3 の乾燥菌体で約 50% と推定された。これは β -ヒドロキシ酪酸重合体の粒子径の差による表面積の差に起因すると考える。

【0056】

胃・小腸のバイパス性試験例:

参考例1で得た β -ヒドロキシ酪酸の単独重合体、および、参考例2で得た β -ヒドロキシ酪酸と β -ヒドロキシ吉草酸の共重合体について、市販のアミラーゼ、ペプシン、トリプシン、リパーゼ、による分解性を調べた。

それぞれ100mg付近で秤量し、以下の胃や小腸のpH環境を模した酵素水溶液(0.1重量%濃度)50ml中に投入し、37℃で所定時間(胃を想定:6時間、小腸を想定:10時間)振とう後にろ過回収した。いずれの場合も96%以上の回収率で重合体を得られ、操作誤差範囲内で分解は認められなかった。本試験により、本発明の組成物が胃や小腸の酸・アルカリ性環境や消化酵素によって分解されないことを確認した。

【0057】

使用した酵素水溶液は以下の通りである。

ペプシン:胃液類似液(塩酸水溶液pH=1.5)

アミラーゼ:胃液類似液(塩酸水溶液pH=5.5、塩化カルシウム0.03重量%)

トリプシン:腸液類似液(炭酸水素ナトリウム水溶液pH=8.0)

リパーゼ:腸液類似液(炭酸水素ナトリウム水溶液pH=7.5、塩化カルシウム0.03重量%)

【0058】

〔実施例1〕:ラットにおける2週間の飼育

使用ラット:Wistar系雄性ラット6週齢(n=5)

基本飼料:ラボMRストック(日本農産工業製)自由摂取

被検飼料:基本飼料に参考例1で得た β -ヒドロキシ酪酸重合体の粉末を5重量%添加自由摂取

給水:自由摂取

飼育:各ラットは代謝ケージで個別に飼い、3日間の馴化後、試験群には被検飼料を対照群には基本飼料を2週間自由摂取させた。毎朝定時に餌、飲水を新しくし、それらの残存量から1日の摂取量を計算した。最後の1週間は1日分の糞を同じく回収し秤量後、半分を乾燥して水分率の測定等に用いた。残りをアンモニア濃度等の分析に供した。飼育最終日、ラットを屠殺、解剖し定法に従って各臓器の秤量や盲腸内容物の分析等を行った。

【0059】

80℃48時間乾燥した糞便を粉碎し約1gを分取秤量した後、1,2-ジクロロエタンを用い加熱還流下で抽出し、3倍容のn-ヘキサンを加えて β -ヒドロキシ酪酸重合体の沈殿を回収・秤量した。糞中に含まれる β -ヒドロキシ酪酸の残存量から大腸内の分解率を計算した。

その結果、糞中の重合体の含有率は平均で7.9乾燥重量%であり、大腸内の分解率に換算すると試験群平均で39.3%(標準偏差=6.2%)であった。

【0060】

本実施例の結果、次のような効果が確認された。

飼料要求率の向上(+14%)、飲水量の減少(-10%)、糞の水分率の低下(-15%)およびこれに伴う湿潤重さの減少、糞中の総アンモニア量の減少(-14%)、盲腸内pH上昇、胃内容物の減少(-61%)、臓器の重さ減少(小腸:-19%、腎臓:-4%)において統計的有意差(p<0.05)が観察された(表2)。

【0061】

また統計的な傾向(p<0.1)として、増体重の増加(+19%)、盲腸内容物重さの減少(-24%)、結腸の重さ減少(-11%)なども認められた(表2)。

以上のような、消化管内の摂取物の滞留が減少し、一部の臓器の重量が減少することは、実際の飼料効率も測定値よりも良く筋肉等の増加を示唆するものである。

【0062】

また、盲腸内容物の所定量を70重量%過塩素酸で前処理し、そのろ液をイオンクロマトグラフィーにより分析して、盲腸内有機酸を定量した。対照群と試験群において有機酸

の種類や量に有意差はなかった。試験群においても、前述のin vitroの大腸内細菌による分解試験で観察された重合体分解生成物のピークは観察されなかったが、試験群では多くの生理作用が観察されたことから、重合体分解生成物である β -ヒドロキシ脂肪酸モノマーおよびオリゴマーは速やかに吸収されたものと推測する。

【0063】

さらに嗅覚や視覚により認識された差異としては、試験群の方が、糞便の臭気は刺激が少なかった。また、大腸等内臓器官の血行色が鮮明であった。

【0064】

【表2】

ラットによる飼育試験（2週間）結果

	試験群（標準偏差）	対照群（標準偏差）
飼料摂取量 乾燥 g	261.8 (8.4)	254.3 (23.9)
体重増加* g	56.9 (5.2)	47.8 (7.6)
飼料要求率** g/g	4.63 (0.30)	5.36 (0.41)
飲水量** g/日	27.2 (1.2)	30.2 (1.6)
g/g体重・日（最終5日間）	0.152 (0.016)	0.166 (0.015)
糞の水分率** 重量%	47.7 (5.9)	56.0 (4.6)
糞中総アンモニア量** mM	3.95 (0.79)	4.58 (0.83)
盲腸内 pH**	6.90 (0.16)	6.47 (0.15)
盲腸組織 g	7.80 (0.75)	8.63 (1.58)
盲腸内容物* g	20.70 (6.78)	27.29 (4.75)
結腸組織* g	7.17 (0.77)	8.05 (0.13)
結腸内容物 g	8.36 (5.42)	9.75 (2.07)
肝臓 g	41.14 (2.21)	43.72 (5.51)
胃組織 g	7.95 (0.82)	8.19 (0.39)
胃内容物** g	5.55 (2.98)	14.16 (5.84)
小腸** g	34.75 (5.90)	42.81 (4.27)
腸間膜脂肪 g	9.61 (0.93)	8.53 (2.25)
腎臓** g	8.08 (0.22)	8.41 (0.16)
副腎 g	0.24 (0.08)	0.28 (0.08)
腎周囲脂肪 g	6.94 (1.80)	6.16 (1.04)
脾臓 g	2.38 (0.24)	2.46 (0.18)
心臓 g	3.84 (0.22)	4.03 (0.27)
精巣 g	12.21 (0.38)	12.22 (0.14)
精巣周囲脂肪 g	8.77 (0.85)	9.45 (2.62)

飼料要求率：飼料摂取量 g / g 体重増加

糞中の総アンモニア量：糞便を純水で希釈して遠心上澄をインドフェノール法で分析

* : $p < 0.1$ ** : $p < 0.05$

【0065】

上記のごとく β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を飼料に配合することにより、飼料効率や糞便への作用のみならず消化器官や腎臓など他の器官にまで及ぶ作用が観察された。

【0066】

〔実施例2〕：離乳後のブタを用いた1ヶ月の豚房飼育結果

豚房飼育におけるブタの成長および糞便量・臭気への効果を調べた。

ブタ：3元交雑種離乳期子豚24頭使用。

群分け：1週間の馴化期間後、体重に配慮して試験群、対照群に群分けした。

飼育条件：各群を3グループ（各グループ雄2頭、雌2頭合計4頭）に分けて、グループ毎に1つの豚房にいれ不断給餌により飼育した。

試験期間：肥育前期のうち4週間

基礎飼料：離乳期ブタ用市販飼料（日本配合飼料コロミールGS／抗菌剤未含有）

被検飼料：基礎飼料に参考例2で得た（ヒドロキシ酪酸－ヒドロキシ吉草酸）共重合体5重量%添加

給水：自由摂取

【0067】

測定項目：体重（個体：1週間毎）、飼料摂取量（グループ：1週間分合計量を測定）、水摂取量（グループ：毎日）、糞量（グループ：毎日）を測定した。さらに、糞便の肉眼観察と個別の肛門観察を行い、糞便臭気を測定した。

【0068】

糞便臭気の測定としては1週間毎に糞便中のアンモニア、揮発性脂肪酸、硫化水素、全メルカプタン類を測定した。グループ毎に1日分の糞便を採取してポリバケツに入れ蓋を開けたまま1日放置後、分取1kgをトレイに広げて100Lのポリ袋に入れ無臭空気を充満して封をした。1時間後にガス検知管を用いてヘッドスペース中の濃度を測定した。

【0069】

<豚房飼育の結果>

体重増加・飼料要求率：

ブタは当初の体重10kg前後から25kg前後に成長した。離乳後の成長の速い時期に当たり、統計的には差は無かったが、飼料要求率は試験群の方が数%良い値であった（表3）。なお、実施例1で観察されたように、ブタにおいても試験群は摂取飼料の胃腸内滞留分が少ない可能性がある。このことは試験群において、筋肉等の実質の増加量が多く、有意な飼料要求率の差となる可能性を示唆する。次の実施例3で得られた窒素の蓄積率が試験群のほうが高い傾向であったという結果は、これを支持するものである。

【0070】

【表3】

離乳後ブタの豚房飼育（1ヶ月）結果

	試験群（標準偏差）	対照群（標準偏差）
体重増加 kg	15.1（1.3）	15.0（0.8）
グループ飼料摂取量 kg	135.8（16.5）	139.1（3.2）
飼料要求率 kg/kg	2.25（0.08）	2.32（0.17）
飲水量 kg	454（118）	423（45）
グループ排泄物量 kg	50.0（9.1）	49.6（4.4）

* : $p < 0.1$ ** : $p < 0.05$

【0071】

軟便・下痢抑制の効果：

飼育期間を通して、正常な糞をしたブタは、対照群が12頭中2頭のみであったのに対し、試験群は12頭中8頭と下痢・軟便の抑制効果が有意に認められた（ $p < 0.05$ ）。

【0072】

排泄物からの臭気：

対照群の排泄物の方が刺激の強い臭気であった。各臭気成分の測定の結果次のように、試験群において、揮発性脂肪酸が約25%、硫化水素及び全メルカプタン類は40%以上濃度が減少し（表4）、排泄物からの臭気が軽減する傾向や有意差が認められた。

【0073】

【表 4】

ブタの排泄物からの揮発性臭気成分の試験（4 週間）結果

臭気成分 (ppm)	試験群 (標準偏差)	対照群 (標準偏差)
揮発性アンモニア	0.8 (0.8)	0.6 (0.3)
揮発性脂肪酸 1-4 週*	6.9 (3.2)	9.6 (4.1)
3-4 週**	4.8 (0.9)	6.4 (1.4)
硫化水素*	1.1 (0.9)	1.9 (1.2)
全メルカプタン類*	0.9 (0.6)	1.7 (1.4)

*: $p < 0.1$ **: $p < 0.05$

【0074】

〔実施例 3〕：ブタの代謝ケージにおける飼育

実施例 2 の終了後、体重がそろそろように雄を 4 頭ずつ選別して代謝ケージに移した。3 日間そのままの餌で不断給餌を続けて馴化を行い、ブタの糞量・尿量、窒素代謝への効果を検討した。

飼料：実施例 2 で用いた飼料

試験期間：5 日間

測定項目：体重（試験前後）、飼料摂取量、水摂取量、糞便量（1 時間毎個別採取。冷蔵保存後 1 日分を秤量。半量を乾燥処理、残り半量は凍結保存。）、尿量（1 時間毎個別採取。冷蔵保存後 1 日分を秤量。硫酸酸性下、冷蔵保存。）

分析項目：糞便中の本被検物質質量・水分率・窒素排泄量（ケルダール法で分析）、尿中の窒素排泄量（ケルダール法で分析）

【0075】

<代謝ケージ内飼育の結果>

実施例 1 と同様にして回収した糞便中の共重合体を定量した。

その結果、試験群の糞中の重合体の含有率は平均で 26.3 乾燥重量%、大腸内での分解率に換算すると平均で 52.2%（標準偏差 = 3.4%）と分解が確認された。

【0076】

観察された身体的作用：表 5

対照群の飼料摂取量が有意に減少したのが観察された。直前の豚房飼育の終盤の 1 日当りの摂取量は約 1.4 kg だったが、対照群では、2 割以上摂取量が減少した日があった（平均 1.75 日）。試験群ではこのような現象はなく、摂取量は減らなかった。対照群のこの減少は、代謝ケージの狭い空間で飼育するストレスが原因と推定される。それに対し試験群は減らず、本発明の効果としてストレス緩和の作用が認められた。

【0077】

排便回数は、対照群平均 25 回に比して試験群は平均 32.5 回と有意に多く（+30%）観察された。便量は飼料摂取量が多かった影響で試験群が多い傾向を示した（+28%）。腸管運動が活発化して、便通が良くなる効果を観察した。

【0078】

排尿回数とともに 40 回程度で有意差はなかったが、尿量は対照群の平均 4,452 g に対し試験群が平均 3,946 g と少ない傾向（-11%）を観察した。さらに、糞水分も対照群の 69.4% に対し、試験群では 62.6% と有意に低かった（-10%）。

以上のように排便回数の増加や尿量の減少など、本発明の効果に関する新しい知見が得られた。

【0079】

【表5】

ブタの代謝ケージ飼育試験（5日間）結果

	試験群（標準偏差）	対照群（標準偏差）
飼料摂取量** kg	7.14 (0.44)	6.41 (0.34)
体重増加 kg	3.0 (1.0)	2.9 (0.8)
飲水量 kg	16.1 (3.0)	16.2 (1.0)
飼料要求率 kg/kg	2.51 (0.60)	2.24 (0.65)
排便回数** 回	32.5 (3.4)	25.0 (4.0)
排便量* g	1,751 (207)	1,367 (362)
排尿回数 回	40.3 (5.1)	41.5 (9.4)
排尿量* g	3,946 (132)	4,452 (499)
糞水分率** 重量%	62.6 (2.0)	69.4 (1.1)

* : $p < 0.1$ ** : $p < 0.05$

【0080】

窒素収支への作用:

ケルダール法によって分析した糞尿中の窒素量、および飼料乾物率（89.5%）、飼料のCP値（26.0%）と窒素量への換算係数（6.25）を用いた窒素出納を表6にまとめた。

【0081】

窒素摂取量や糞尿中への窒素排出量に有意差はなかった。しかし窒素蓄積量は、対照群の172.0gに対し、試験群は189.6gと多い傾向が認められた。体内蓄積率は試験群のほうが高いことが示唆されるので、確認のため、百分率で整理しなおした結果を表7に示す。その結果、試験群は窒素の体内蓄積が増えて排出が減り、しかも尿中に排出される割合が減る（糞中に排出される割合が増える）という新しい効果が傾向として認められた。即ち、本発明の組成物によって、飼料要求率の向上や筋肉増加の効果のみならず、糞に比べて含有窒素成分の処理が困難な尿の処理コストの低減が期待される。

【0082】

【表6】

ブタにおける窒素出納試験結果

	試験群（標準偏差）	対照群（標準偏差）
窒素摂取量 g	252.7 (15.6)	238.5 (12.4)
総窒素排出量 g	63.1 (4.2)	66.5 (4.7)
窒素蓄積量* g	189.6 (13.6)	172.0 (7.1)
糞中窒素量 g	19.5 (0.8)	19.4 (1.1)
尿中窒素量 g	43.7 (4.0)	47.1 (3.5)

* : $p < 0.1$ ** : $p < 0.05$

【0083】

【表 7】

窒素出納試験の解析結果

		試験群 (標準偏差)	対照群 (標準偏差)
窒素蓄積率*	%	75.0 (1.4)	72.1 (2.3)
窒素総排出率*	%	25.0 (1.4)	27.9 (2.3)
糞中排出率	%	7.7 (0.4)	8.1 (0.6)
尿中排出率*	%	17.3 (1.4)	19.8 (1.6)
糞尿排出 割合 %	糞中*	30.9 (1.7)	29.1 (0.3)
	尿中*	69.1 (1.7)	70.9 (0.3)

* : $p < 0.1$ ** : $p < 0.05$

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸を大腸へ送達させるための方法および組成物を提供する。

【解決手段】 本発明は、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸またはそのオリゴマーを大腸へ送達するための、 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体を含有する組成物を提供する。 β -ヒドロキシ短～中鎖脂肪酸重合体は経口投与した場合に胃、小腸で分解されず大腸まで送達され、大腸において大腸内細菌により分解されて種々の生理作用を発揮する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 0 8 9 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 1 7 2 2 3]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 9 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市右京区花園扇野町 4 9 番地

氏 名

有限会社アーザス